

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 3 月 11 日 (11.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/020633 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/13, C07K
16/24, A61K 39/395, A61P 19/02, 29/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010923

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 28 日 (28.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-253036 2002 年 8 月 30 日 (30.08.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒860-8568 熊本県熊本市大塚一丁目 6 番 1 号 Kumamoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 杉村 和久 (SUGIMURA, Kazuhisa) [JP/JP]; 〒891-0103 鹿児島県鹿児島市皇徳寺台 5-2 0-5 Kagoshima (JP). 吉

崎 和幸 (YOSHIZAKI, Kazuyuki) [JP/JP]; 〒659-0042 兵庫県芦屋市緑町 3-8-4 Hyogo (JP). 中島 敏博 (NAKASHIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4-1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 佐々木 巧 (SASAKI, Takumi) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4-1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP).

(74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HUMAN ANTIHUMAN INTERLEUKIN-6 ANTIBODY AND FRAGMENT OF THE ANTIBODY

(54) 発明の名称: ヒト抗ヒトインターロイキン-6 抗体及び該抗体フラグメント

(57) Abstract: It is intended to provide a substance efficacious in treating an immunopathy in which interleukin-6 (IL-6) participates. Using the phage antibody method, a human antihuman IL-6 antibody and a human antihuman IL-6 antibody fragment showing a high affinity for human IL-6 are obtained. The above antibody and antibody fragment are expected as being useful as remedies for inflammation and an immunopathy caused by IL-6.

(57) 要約: インターロイキン-6 (IL-6) が関与する免疫異常性疾患の治療に有効な物質を提供する。ファージ抗体法を用いて、ヒト IL-6 に対して高い親和性を有するヒト抗ヒト IL-6 抗体及びヒト抗ヒト IL-6 抗体フラグメントを得た。当該抗体及び抗体フラグメントは、IL-6 が原因となって惹起される炎症、免疫異常性疾患の治療薬として期待される。

WO 2004/020633 A1

明 細 書

ヒト抗ヒトインターロイキン-6抗体及び該抗体フラグメント

技術分野

本発明は、ヒトインターロイキン-6（以下、IL-6）に結合し、IL-6
5 とその受容体との結合を阻害するヒト抗ヒトIL-6抗体及び該抗体フラグメント、及びそれをコードする遺伝子断片に関する。本発明の抗体及び抗体フラグメントは、IL-6が原因となって惹起される炎症、免疫異常性疾患の治療薬として期待される。

背景技術

10 IL-6はT細胞、マクロファージ、繊維芽細胞、筋肉細胞などから、マイトジェン刺激、ウイルス感染、IL-1などの刺激により産生される分子量21,000の糖タンパク質である。ヒトでは184アミノ酸からなり、第7染色体上に遺伝子が存在する。その生物活性は多様で、1)細胞増殖誘導（ハイブリドーマ、T細胞、角質細胞、腎メサンジウム細胞）、2)細胞増殖抑制（骨髓性白血病細胞株、
15 悪性黒色種細胞株）、3)細胞分化誘導及び細胞の特異的タンパク質の産生誘導（褐色細胞腫株の神経分化、キラーT細胞分化、巨核球成熟、骨髓性白血病細胞株のマクロファージ分化、B細胞の抗体産生、肝細胞の急性期タンパク質産生）などの機能を有する。このような多様な生物活性により、疾患との関連性も指摘されていたが、近年、1)慢性関節リウマチ、心房内粘液腫、キャッスルマン氏
20 病、AIDSなどでの高γグロブリン血症や自己免疫症状、2)メサンジウム増殖性腎炎、3)乾癬、4)AIDSカポジ肉腫などの発症に関与することが知られている。また最近では、運動直後に骨格筋から多量のIL-6が産生され、その視床下部を刺激して色々な神経ホルモンの分泌を促し、免疫系に影響を与えることが知られている（免疫学辞典第1版、49頁、1993）。

25 とりわけ、IL-6が関与する疾患の中で慢性関節リウマチ（Rheumatoid arthritis; RA）は日本全国で約70万人が罹患し、近年漸増の傾向にあり、患者の高齢化も進み社会問題となりつつある（Ogata A.ら、臨床病理 1999 Apr; 47(4): 321-326 [Advances in interleukin-6 therapy]）。

慢性関節リウマチの原因は不明であるが、関節腔内で起こった自己免疫反応が

持続し慢性化した自己免疫疾患であり、難治性特定疾患に指定されている。これまで I L - 6 との関連性について調べられ、患者の関節液中に多量に存在し、炎症惹起だけでなく、滑膜繊維芽細胞の増殖にも関わっていることが明らかにされている。また自己抗体の産生を促している可能性も考えられる (Nishimoto N. ら、Clinical application of interleukin-6 receptor antibody., 日本免疫学会誌 1997; 20: 87-94) 。

したがって、I L - 6 の生物活性を阻害するような抗 I L - 6 抗体を作れば、RA を含めた幾つかの免疫異常性疾患の対症療法的治療薬になる可能性があり、実際に検討が進められている (Mihara M. ら、Br. J. Rheumatol. 1995 Apr; 34(4): 321-325; Mihara M. ら、Clin. Immunol. 2001, 98: 319-326) 。

発明の開示

(発明が解決しようとする技術的課題)

RA では患者の症状の進行状況に応じて、非ステロイド系消炎鎮痛剤、ステロイド剤、免疫抑制剤、代謝阻害剤等の薬剤療法や人工関節などの外科的療法など多種多様な治療法が疾患のステージに応じて施される。しかしながらこれらはいずれも RA を根治するような治療法ではなく、長期使用や大量使用による副作用の問題も存在している。I L - 6 は炎症拡大という役割を果たしているため、患者が感じる苦痛の大きな原因となっており、I L - 6 の活性を阻害することにより苦痛が軽減出来る可能性が指摘されていた。そのための候補としてヒト型化抗 I L - 6 抗体が検討の対象として使われてきた (Montero-Julian F.A. ら、Blood 1995 Feb 15; 85(4): 917-24; Monier S. ら、Clin. Exp. Rheumatol. 1994 Nov-Dec; 12(6): 595-602; Wendling D. ら、J. Rheumatol. 1993 Feb; 20(2): 259-62) 。一方で、I L - 6 はミエローマ細胞の増殖因子としての活性を有しており (前述: 免疫学辞典第 1 版、49 頁、1993) 、このため I L - 6 と高親和力で結合する抗体を産生するハイブリドーマが得られても、産生された抗体によって培地中の I L - 6 が中和されてしまい増殖できなくなるので、結果的に高親和性の抗 I L - 6 抗体は得られにくいという問題もあった。佐藤らが報告しているマウス由来抗ヒト I L - 6 抗体は 11nM の高親和性を示したが、解離速度が 3×10^{-2} sec と速いものしか得られていない (Sato K. ら、Hum. Antibodies Hybridomas

1996; 7(4): 175-83)。この様な従来の方法で得られた解離速度の速い抗体を用いて I L-6 の活性を阻害するためには高濃度を維持する必要があった。ましてや完全ヒト抗体でそのような活性を持つ抗体は知られていない。

5 またヒト型化抗体では、完全ヒト抗体と異なり、投与された患者では抗 I L-6 抗体の活性を阻害するような抗体（阻止抗体）が作り出される可能性も否定できなかった。

（その解決方法）

そこで、本発明では、ファージ抗体法を用いて、スクリーニング系を工夫することにより完全ヒト抗ヒト I L-6 一本鎖 F v (s c F v) 分子を取得し、その
10 抗体の V H 鎖及び V L 鎖を明らかにした。さらに、その性状を解析し、当該 s c F v が、ヒト I L-6 に対して従来得られていた各種動物由来の抗体よりも特に解離速度が遅く（ 10^{-3} sec オーダー、従来より約 40 倍解離速度が遅い）、かつ従来の抗体と同程度以上の高い親和性を有すること、また I L-6 依存性細胞株の増殖を濃度依存的に抑制することを明らかにした。

15 （従来技術より有効な効果）

このような完全にヒト由来でかつ高親和性の抗体を用いることにより、キメラ抗体やヒト型化抗体に比べて低い抗体濃度で治療効果を発揮でき、従ってこの抗体に対する抗イディオタイプ抗体の産生も極めて低く抑えることが可能になり、抗 I L-6 アンタゴニストとして、I L-6 依存性の白血病や慢性関節リウマチ
20 などの自己免疫疾患の治療薬として優れた治療効果を有する抗ヒト I L-6 抗体薬を提供することができると期待される。また副作用が少なく活性が強い、急性の炎症の治療薬としての利用も期待できる。

図面の簡単な説明

図 1 は、IL-6gk シーズ由来の IL6gk3-2scFv の組換え I L-6、ヒト血清アルブミン (H S A)、AB 型血清、単球走化性タンパク質 1 (monocyte
25 chemoattractant protein-1; MCP-1)、MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) との反応性を ELISA で測定した結果を示すグラフである。

図 2 は、BIA CORE により測定した IL6gk3-2scFv の IL-6 との結合親和力を測定した結果を示すグラフである。

図 3 は、I L - 6 依存性細胞株KT-3の I L - 6 依存性の増殖応答をIL6gk3-2scFvが抑制した結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

5 健康者 20 名分の末梢血 B リンパ球より、R T - P C R 法にて、免疫グロブリン重 (H) 鎖、軽 (L) 鎖 c D N A を増幅、更に両者をリンカーDNAで結合し、健康者リンパ球由来の V H 鎖と V L 鎖のランダムな組み合わせによる一本鎖 F v (s c F v) D N A を作製した。

10 このscFv DNAをファージミドベクターpCANTAB5Eに組み込み、10⁹クローンからなる健康者由来 s c F v 提示ファージライブラリーを作製した。このライブラリーを、固相に固定化されたヒト I L - 6 と結合させて回収、濃縮し、抗ヒト I L - 6 F v 提示ファージクローンをスクリーニングした。その結果、スクリーニングされた s c F v クローン (IL6gk3-2) は、ヒト I L - 6 と結合する s c F v 抗体を産生した。

15 クローンIL6gk3-2が産生する s c F v 抗体は、一本鎖にも拘わらず通常の完全型抗体と同等の親和力でリガンド (I L - 6) に特異的に結合した。

クローンIL6gk3-2が産生する s c F v 抗体は、ヒト I L - 6 に依存して増殖する細胞株 K T - 3 に加えたときに I L - 6 依存的増殖応答を濃度依存的に阻害した。

20 上記阻害活性を有する s c F v クローンの V H 鎖及び V L 鎖のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列を、配列番号 1 及び 2 (V H 鎖) 、 及び配列番号 3 及び 4 (V L 鎖) にそれぞれ示す。

さらに、上記配列中、V H 鎖及び V L 鎖の相補性決定領域 (C D R 1 ~ 3) のアミノ酸配列を下記に示す。

[V H 鎖]

25 C D R 1 : Lys Tyr Tyr Met Ala <配列番号 5 >

C D R 2 : Thr Ile Ser Asn Ser Gly Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly <配列番号 6 >

C D R 3 : Glu Tyr Phe Phe Ser Phe Asp Val <配列番号 7 >

[V L 鎖]

CDR 1 : Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Trp Val Ala <配列番号 8 >

CDR 2 : Asp Gly Ser Ser Leu Gln Ser <配列番号 9 >

CDR 3 : Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Ile Thr Phe <配列番号 10 >

上記VH鎖及びVL鎖のいずれかまたは両方の可変領域を有する抗体フラグメントは、ヒト由来抗ヒトIL-6抗体の可変領域を有し、ヒトIL-6と強く反応して、IL-6とIL-6受容体間の結合に対して阻害作用を示す。

本発明で開示されるヒト抗ヒトIL-6抗体のVH鎖及び／またはVL鎖は、ファージ抗体法を用いてscFvの形で得られたものであるが、開示したVH鎖及び／またはVL鎖をヒト免疫グロブリンの定常部と連結した完全分子型ヒト抗ヒトIL-6抗体、またヒト免疫グロブリンの定常部の一部と組み合わせたFab、Fab'またはF(ab')₂などのヒト抗ヒトIL-6抗体フラグメント、さらにscFvをヒト免疫グロブリンの定常部と結合させたヒト抗ヒトIL-6一本鎖抗体(scAb)などの他のヒト抗ヒトIL-6抗体フラグメント、並びにこれら抗体または抗体フラグメントをコードする遺伝子断片をも本発明は包含する。また、これらの抗体及び抗体フラグメント蛋白分子に高分子修飾剤を結合させた修飾蛋白分子も本発明に包含される。

産業上の利用の可能性

以上より、本発明のヒト抗ヒトIL-6抗体及び該抗体フラグメント分子は、IL-6とIL-6受容体との結合によって引き起こされる種々の免疫応答を阻害することができ、消炎鎮痛剤としてあるいは自己免疫疾患の治療及び予防のための薬剤として使用することができる。

さらに、本発明のヒト抗ヒトIL-6抗体及び該抗体フラグメント分子は、その特性からヒト末梢血中または筋肉内のIL-6発現細胞を検出或いは測定する免疫学的測定法を提供することが可能である。

また、本発明のヒト抗ヒトIL-6抗体及び該抗体フラグメント分子は、免疫学的に不活性な吸着物質からなる免疫吸着物質と吸着させた複合体とすることにより多くの応用が可能になる。たとえば、ヒト末梢血中のIL-6をイムノアフィニティクロマトグラフィにより精製することができる。さらに、遺伝子組換え法により形質転換された培養細胞から産生される培養上清中のIL-6の精製に

用いることが可能である。

また、本発明のヒト抗ヒト I L - 6 抗体の可変部位のペプチドまたはその誘導体は、それを認識するペプチドまたは抗イディオタイプ抗体を、ライブラリーより単離する新たな手段を提供する。得られるペプチドと抗イデオタイプ抗体、及びその誘導体は、I L - 6 の中和による急性炎症や自己免疫疾患の治療に有効であることが期待できる (Vreugdenhil G. ら、Rheumatol. Int. 1990; 10(3): 127-30; Hirano T. ら、Ric. Clin. Lab. 1989 Jan-Mar; 19(1): 1-10)。

以下、実施例にそって本発明をさらに詳細に説明するが、これら実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

《実施例 1 : 健常者からのファージライブラリーの構築》

ファージライブラリーの構築は、J. D. Marks ら (J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991) により報告されている方法を参考に調製した。

健常者 20 名由来末梢血より Ficoll を用いた比重遠心法にてリンパ球を分離し、P B S で十分に洗浄後、ISOGEN (日本ジーン) で処理して、total RNA を調製した。この total RNA を 4 つに分割し、ヒト I g G、I g M、 κ 鎖、 λ 鎖の定常領域に特異的なプライマーを使用し、first strand cDNA synthesis kit

(Pharmacia biotech) にて、それぞれの c D N A を作製した。この c D N A をテンプレートにして、Marks らが報告したのと同様に V H (γ または μ) と J H 及び V κ と J κ 、V λ と J λ の組合せで各ジーンファミリーに特異的なプライマーを用いて、それぞれの抗体 V 領域遺伝子をポリメラーゼチェーンリアクション (P C R) 法にて増幅した。

更に、V H (γ または μ) と V κ 、及び V H (γ または μ) と V λ をリンカー DNA を用いて、アッセンブリー P C R 法 (McCafferty, J. ら: Antibody Engineering - A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1996) により結合させ、一本鎖 s c F v D N A を作製した。scFv DNA は更に P C R を用いて、NotI 及び SfiI 制限酵素部位を付加し、アガロースゲルで電気泳動後、精製した。精製した scFv DNA は制限酵素 SfiI (Takara) と NotI (Takara) で消化後、ファージミド pCANTAB5E (Pharmacia) にクローニングした。scFv DNA を結合させた pCANTAB5E は V H (γ) - V κ 、V H (γ) - V λ 、V H (μ) - V κ 、V H (μ) - V

λ 毎にエレクトロポレーションにより大腸菌TG1に導入した。形質転換したTG1の数から、VH(γ)-Vκ、VH(γ)-Vλ、VH(μ)-Vκ、VH(μ)-Vλはそれぞれ 1.1×10^8 、 2.1×10^8 、 8.4×10^7 、 5.3×10^7 クローンの多様性を有すると評価された。この形質転換したTG1から、M13K07ヘルパーファージを用いて

5 ファージ抗体を発現し、健常人由来 s c F v 提示ファージライブラリーを調製した。

《実施例2：パンニング》

ヒト I L-6 は0.1M NaHCO₃ 1 mLに溶解し、35mmのディッシュ（岩城）に4℃で一晩反応させて固定化した。0.5%ゼラチン/PBSを用いて20℃で2時間ブロッキングした後、0.1%Tween20-PBSで6回洗浄した。これに健常人由来の抗体ファージライブラリー（一本鎖抗体提示ファージ液）を0.9mL (1×10^{12} tu/mL) 加え、反応させた。

10

0.1%Tween20-PBSで10回洗浄した後、1.0mLのグリシン緩衝液（pH2.2）を加え、I L-6 と結合する一本鎖抗体提示ファージを溶出させた。溶出したファージは1M Tris (hydroxymethyl)aminomethane-HCl, pH9.1を加えてpHを調整した後、対数増殖期の大腸菌TG1に感染させた。感染後のTG1は3000 × g, 10分で遠心分離して、上清を除き、200 μLの2 × YT培地で懸濁し、SOBAGプレート（2%グルコース、100 μg/mlのアンプシリン含有SOBプレート）に播き、30℃のふ卵器中で一晩培養した。生じたコロニーは適量の2 × Y T培地を加えスクレイパー

15

20 (Coastor) を使って懸濁、回収した。

このTG1液50 μLを、30mLの2 × Y T A G培地に植え、ヘルパーファージを用いてレスキューし、スクリーニング後のファージライブラリーを調製した。

健常人由来ファージライブラリーVH(γ)-Vκ、VH(γ)-Vλ、VH(μ)-Vκ、VH(μ)-Vλ、それぞれについて前述のI L-6 固定化プレートを用いてパンニングを計4回行った。4回目のパンニング後に、SOBAGプレートから任意にクローンを抽出し、s c F vの発現の確認及びI L-6 ELISAによる特異性の確認と塩基配列の解析を行った。

25

《実施例3：スクリーニングI L-6 ELISA》

分離したクローンのスクリーニングのためのELISAは以下のように行った。ヒ

ト I L-6 及びコントロール蛋白をELISAプレートに固定化してスクリーニングに用いた。1.25 μ g/mLのヒト組換え I L-6、2.5 μ g/mLのヒト血清アルブミン (HSA)、1.25 μ g/mLのヒト単球走化性タンパク質1 (MCP-1)、ヒトMIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1- α) またはヒトAB型血清を40 μ L/well
5 ELISAプレート (Nunc) に入れ、4 $^{\circ}$ Cで16時間静置し、固定化した。固定化プレートは、0.5%BSA、0.5%ゼラチン及び5%スキムミルクを含むPBS溶液400 μ L/wellを入れて4 $^{\circ}$ Cで2時間静置し、ブロッキングを行った。

s c F v 提示ファージを含む試料液40 μ L/wellを入れて反応させた後、試料液を捨て洗浄液で5回洗った。ビオチン標識した抗M13モノクローナル抗体

10 (Pharmacia biotech) と反応させ、アルカリフォスファターゼ (AP) 標識した抗マウスIgG抗体と反応させた。洗浄液で5回洗った後、発色基質液 (1 g/mL p-nitrophenyl phosphate (Wako)、10%ジエタノールアミン (Wako) を含むPBS溶液) を50 μ L/well入れ、遮光し、室温 \sim 37 $^{\circ}$ Cで、5 \sim 10分発色させた。マルチプレートオートリーダーNJ-2001 (Inter Med) で405nmの吸光度を測定した結果、評価したクローン全てが、I L-6に特異的であることが確認できた (図
15 1)。

《実施例4：クローンの配列分析》

単離したクローンの s c F v 遺伝子の V H 及び V L の DNA 塩基配列を Dye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction kit (Applied Biosystems) を用いて決定した。ELISA及び配列分析の結果、単離したクローンは4種に分類された。このうち、クローンIL6gk3-2の V H 及び V L の塩基配列をそれぞれ配列番号1及び配列番号3に示す。

《実施例5：s c F v の発現と回収》

25 可溶性 s c F v を大腸菌HB2151を用いて発現させ、大腸菌ペリプラズム画分より回収、粗精製した。更に精製が必要な場合はRAPAS Purification Module (Pharmacia Biotech) 用いて、アフィニティ精製を行った。精製した s c F v 蛋白の純度は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と、s c F v 蛋白のC末端のEtagエピトープを標的にしたウェスタンブロッティングにより確認した。s c F v 蛋白精製品の蛋白濃度の決定には、Protein Assay キット (BIO-RAD) を

用いた。

《実施例6：SPR法による精製s c F vの親和性測定》

BIAcore (BIAcore社) を用いて、SPR法により精製s c F vの親和性を測定した結果、単離されたクローンのうち最も高い親和性を示したクローンIL6gk3-2は、ヒトIL-6に対して 13×10^{-9} Mの解離定数を有すると評価された（図2）。

《実施例7：IL-6依存性細胞株の増殖応答に対する影響》

精製s c F vを用いて、IL-6に依存的に増殖する細胞株KT-3のIL-6依存的な増殖応答に対する阻害効果について検討した。 2×10^4 個/ 200μ l/ウェルに調製したKT-3をIL-6（80pg/ml）と1.25～20 μ g/mlのクローンIL6gk3-2由来の精製s c F v存在下、4日間培養しチミジン取り込みによるDNA合成を評価した結果、クローンIL6gk3-2由来s c F vはKT-3細胞の増殖応答を濃度依存的に抑制することがわかった（図3）。

請求の範囲

1. ヒトインターロイキン-6（以下、IL-6）に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗ヒトIL-6抗体または該抗体フラグメント。

5 2. 少なくとも 1.0×10^{-8} M以下の解離定数を有する請求項1記載のヒト抗ヒトIL-6抗体または該抗体フラグメント。

3. ヒトIL-6に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗ヒトIL-6抗体のVH鎖をコードする遺伝子断片。

4. 当該VH鎖の相補性決定領域（CDR1～3）が下記のアミノ酸配列を有する請求項3に記載の遺伝子断片。

10 CDR1 : Lys Tyr Tyr Met Ala <配列番号5>

CDR2 : Thr Ile Ser Asn Ser Gly Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly <配列番号6>

CDR3 : Glu Tyr Phe Phe Ser Phe Asp Val <配列番号7>

15 5. 当該VH鎖が配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する請求項3または4に記載の遺伝子断片。

6. 当該VH鎖のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されている請求項4または5に記載の遺伝子断片。

7. ヒトIL-6に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗ヒトIL-6抗体のVL鎖をコードする遺伝子断片。

20 8. 当該VL鎖の相補性決定領域（CDR1～3）が下記のアミノ酸配列を有する請求項7に記載の遺伝子断片。

CDR1 : Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Trp Val Ala <配列番号8>

CDR2 : Asp Gly Ser Ser Leu Gln Ser <配列番号9>

CDR3 : Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Ile Thr Phe <配列番号10>

25 9. 当該VL鎖が配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する請求項7または8に記載の遺伝子断片。

10. 当該VL鎖のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されている請求項8または9に記載の遺伝子断片。

11. 請求項3から6のいずれかに記載のVH鎖をコードする遺伝子断片及び請

求項 7 から 10 のいずれかに記載の V L 鎖をコードする遺伝子断片を結合してなる、ヒト I L - 6 に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗ヒト I L - 6 抗体の一本鎖 F v (以下、s c F v) をコードする遺伝子断片。

12. 請求項 3 から 6 のいずれかに記載の V H 鎖をコードする遺伝子断片及び請求項 7 から 10 のいずれかに記載の V L 鎖をコードする遺伝子断片を、それぞれヒト抗体 C H 鎖遺伝子及びヒト抗体 C L 鎖遺伝子と結合してなる、ヒト I L - 6 に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗 I L - 6 抗体をコードする遺伝子断片。

13. 請求項 3 から 6 のいずれかに記載の V H 鎖をコードする遺伝子断片及び請求項 6 から 10 のいずれかに記載の V L 鎖をコードする遺伝子断片を、それぞれヒト抗体 C H 鎖遺伝子の一部及びヒト抗体 C L 鎖遺伝子の一部と結合してなる、ヒト I L - 6 に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗 I L - 6 抗体フラグメントをコードする遺伝子断片。

14. 当該抗体フラグメントが、F a b、F a b'、または F (a b')₂ から選ばれる請求項 13 に記載の遺伝子断片。

15. 請求項 11 に記載の s c F v 遺伝子断片を、ヒト抗体 C H 鎖遺伝子の一部、またはヒト抗体 C L 鎖遺伝子の一部と結合してなる、ヒト I L - 6 に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗 I L - 6 抗体フラグメントをコードする遺伝子断片。

16. 請求項 3 から 15 のいずれかに記載の遺伝子断片を発現ベクターに組み込み、遺伝子組換え法により発現される、ヒト I L - 6 に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗ヒト I L - 6 抗体または該抗体フラグメント。

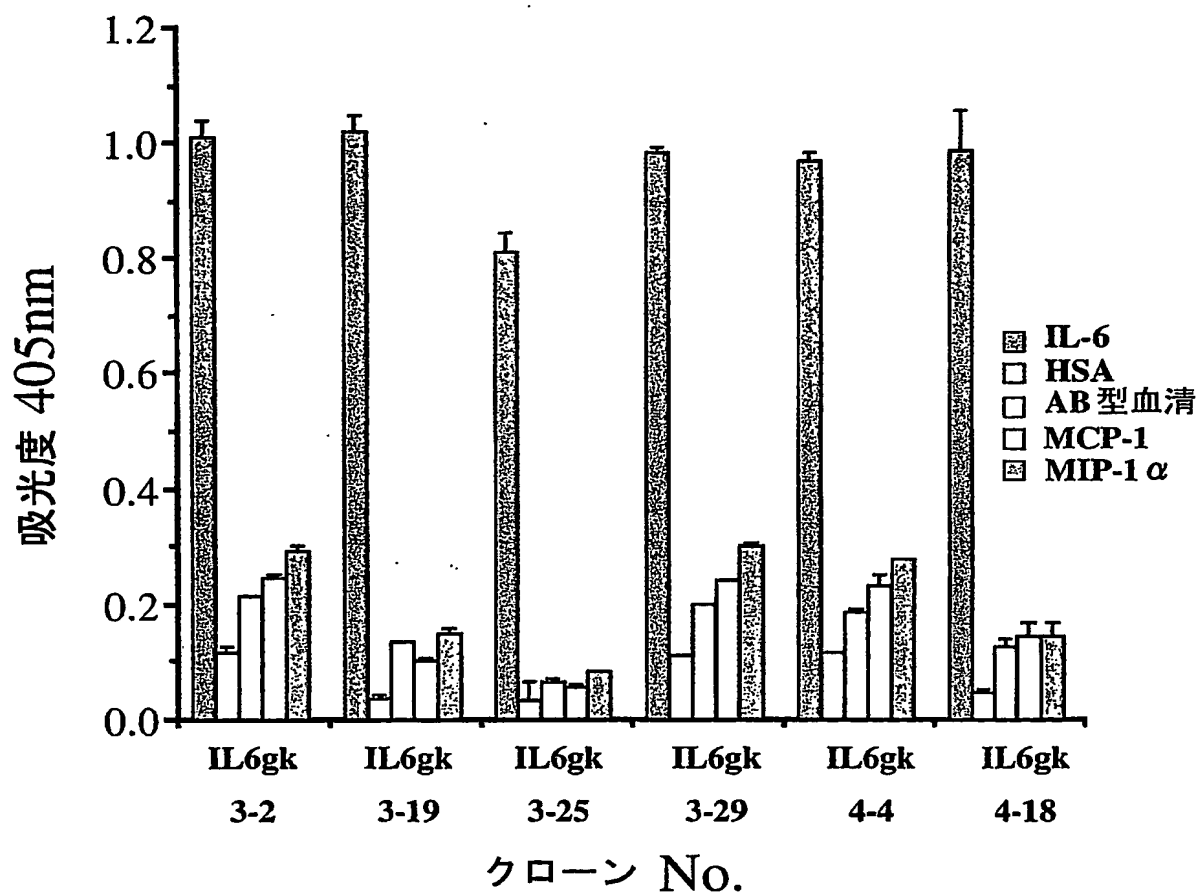
17. 少なくとも 1.0×10^{-8} M 以下の解離定数を有する請求項 16 記載のヒト抗ヒト I L - 6 抗体または該抗体フラグメント。

18. 請求項 1 から 17 のいずれかに記載のヒト抗ヒト I L - 6 抗体または該抗体フラグメントを有効成分として含有する I L - 6 及び I L - 6 受容体の結合活性阻害剤。

19. 請求項 18 に記載の結合活性阻害剤を用いるヒト I L - 6 及びヒト I L - 6 受容体の結合により惹起される炎症及び免疫異常性疾患の予防または治療薬。

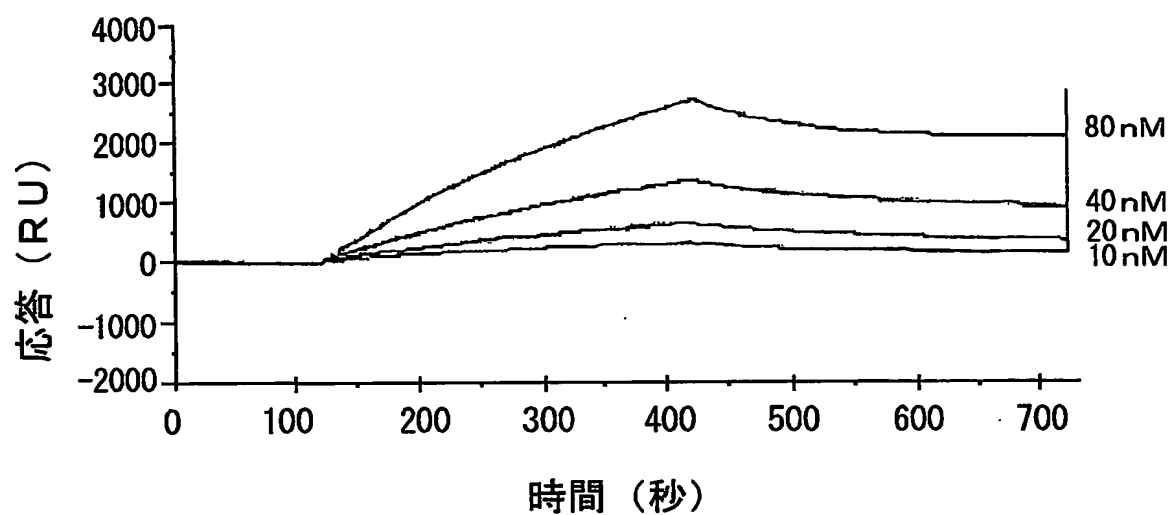
1/3

図 1



2/3

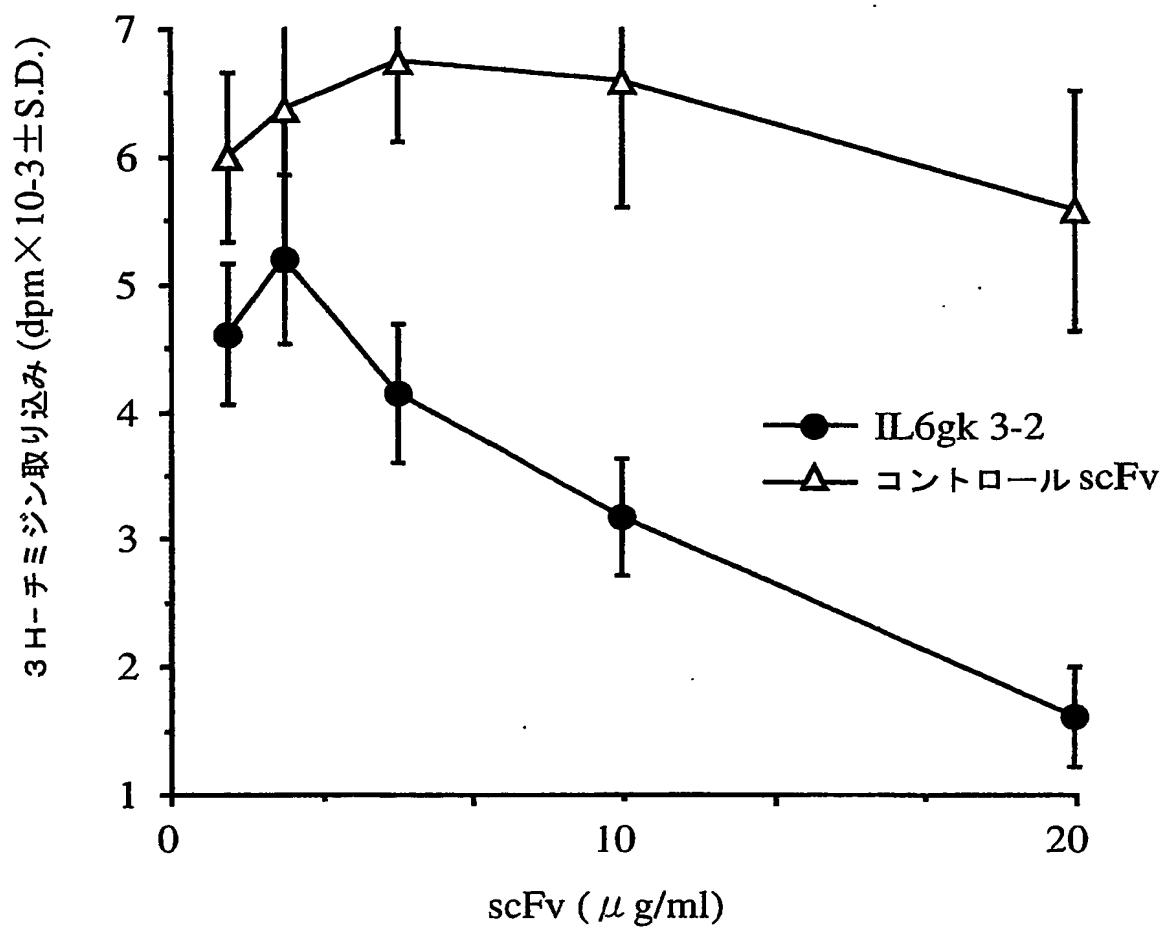
図 2



固定化 タンパク質	リガンド	$k_{\text{ass}}/10^5$ ($\text{sec}^{-1}\text{M}^{-1}$)	$k_{\text{diss}}/10^{-3}$ (sec^{-1})	K_D (nM)
ヒト IL-6	IL6gk3-2	0.6 ± 0.34	0.8 ± 0.34	13

3/3

図 3



SEQUENCE LISTING

<110> Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

<120> Human anti-human interleukin-6 antibody and fragment thereof

<130> 663984

<150> JP 2002-253036

<151> 2002-08-30

<160> 10

<210> 1

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cag gtc aac tta agg gag tct ggg gga gac ttg gtc aag ccc gga ggg 48

Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly

5

10

15

tcc cta aga ctc tca tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc aga aag tat 96

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Lys Tyr

20

25

30

tac atg gcc tgg atc cgc cag gct cca ggg aag ggg ccg gag tgg ctt 144

Tyr Met Ala Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Leu

35

40

45

tca acc att agt aac agc ggt gat atc ata gac tat gca gac tct gtg 192

Ser Thr Ile Ser Asn Ser Gly Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

agg ggc cgg ttc tcc atc tcc agg gac aat gcc cag aag tca ctg tat 240

Arg Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Lys Ser Leu Tyr

65

70

75

80

2/6

ctg caa atg acc tcc ctg aga ccc gac gac tcg gcc atc tat tac tgt 288
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Pro Asp Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcg agg gaa tat ttc ttt tct ttt gat gtg tgg ggc cga ggg aca atg 336
Ala Arg Glu Tyr Phe Phe Ser Phe Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Met
100 105 110
gtc acc gtc tcc tca 351
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Lys Tyr
20 25 30
Tyr Met Ala Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Leu
35 40 45
Ser Thr Ile Ser Asn Ser Gly Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Arg Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Lys Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Pro Asp Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Tyr Phe Phe Ser Phe Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Met
100 105 110

3/6

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gac atc gtg atg acc cag tct cca tct tct gtg tct gca tcg gtg gga 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

gac aga gtc acc atc ttt tgt cgg gcg agt cag gat att agg aat tgg 96

Asp Arg Val Thr Ile Phe Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Trp

20

25

30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggt gag gcc cct aaa tta ttg atc 144

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

tat gat gga tcg agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192

Tyr Asp Gly Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc aca atc agc agc ctg cag cct 240

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt gac agt acc cct att 288

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Ile

85

90

95

acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa cgt 324

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

4/6

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Phe Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Trp

20

25

30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Asp Gly Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Ile

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CDR1 corresponding to amino acids No. 31 to No. 35 in SEQ ID NO: 2

<400> 5

Lys Tyr Tyr Met Ala

1

5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CDR2 corresponding to amino acids No. 50 to No. 66 in SEQ ID NO: 2

<400> 6

Thr Ile Ser Asn Ser Gly Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly

1

5

10

15

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CDR3 corresponding to amino acids No. 99 to No. 106 in SEQ ID NO:

2

<400> 7

Glu Tyr Phe Phe Ser Phe Asp Val

1

5

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CDR1 of corresponding to amino acids No. 24 to No. 34 in SEQ ID

6/6

NO: 4

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Trp Val Ala

1

5

10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CDR2 corresponding to amino acids No. 50 to No. 56 in SEQ ID NO: 4

<400> 9

Asp Gly Ser Ser Leu Gln Ser

1

5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CDR3 corresponding to amino acids No. 89 to No. 98 in SEQ ID NO: 4

<400> 10

Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Ile Thr Phe

1

5

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/10923

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/13, C07K16/24, A61K39/395, A61P19/02, A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/13, C07K16/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Barbara Krebs et al., Recombinant Human Single chain Fv Antibodies Recognizing Human Interleukin-6., J.Biol.Chem., 1998, Vol.273, No.5, pages 2858 to 2865	1-19
A	JOHN WIJDENES et al., HUMAN RECOMBINANT DIMERIC IL-6 BINDS TO ITS RECEPTOR AS DETECTED BY ANTI-IL-6 MONOCLONAL ANTIBODIES., Mol.Immunol., 1991, Vol.28, No.11, pages 1183 to 1192	1-19
A	James D. Marks et al., By-passing Immunization Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage., J.Mol.Biol., 1991, Vol.222, No.3, pages 581 to 597	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
06 November, 2003 (06.11.03)

Date of mailing of the international search report
25 November, 2003 (25.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10923

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	R.Gejima et al., Human single-chain Fv (scFv) antibody specific to human IL-6 with the inhibitory activity on IL-6-signaling., Hum. Antibodies, 2002, Vol.11, No.4, pages 121 to 129	1-19

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/13, C07K16/24, A61K39/395, A61P19/02,
A61P29/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/13, C07K16/24

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Barbara Krebs et al., Recombinant Human Single Chain Fv Antibodies Recognizing Human Interleukin-6. J. Biol. Chem., 1998, Vol.273, No.5, p.2858-2865	1-19
A	JOHN WIJDENES et al., HUMAN RECOMBINANT DIMERIC IL-6 BINDS TO ITS RECEPTOR AS DETECTED BY ANTI-IL-6 MONOCLONAL ANTIBODIES. Mol. Immunol., 1991, Vol.28, No.11, p.1183-1192	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.11.03

国際調査報告の発送日

25.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4N

3228

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	James D. Marks et al., By-passing Immunization Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage. J. Mol. Biol., 1991, Vol. 222, No. 3, p. 581-597	1 - 19
PA	R. Gejima et al, Human single-chain Fv (scFv) antibody specific to human IL-6 with the inhibitory activity on IL-6-signaling. Hum. Antibodies, 2002, Vol. 11, No. 4, p. 121-129	1 - 19